

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 3 月 11 日 (11.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/020638 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/53,
9/04, 1/21 // (C12N 1/21, C12R 1:38)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010541

(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 20 日 (20.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-253752 2002 年 8 月 30 日 (30.08.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アーク
レイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒601-8045 京
都府 京都市 南区東九条西明田町 5 7 Kyoto (JP). ユ
ニチカ株式会社 (UNITIKA LTD.) [JP/JP]; 〒660-0824
兵庫県 尼崎市 東本町 1 丁目 5 0 番地 Hyogo (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 早出 広司 (SODE, Koji) [JP/JP]; 〒152-0013 東
京都 目黒区 南 1-1 3-1 6 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山岡 秀亮
(YAMAOKA, Hideaki) [JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京
都市 南区東九条西明田町 5 7 アークレイ株式会
社内 Kyoto (JP). 星島 光博 (HOSHIJIMA, Mitsuhiro)
[JP/JP]; 〒601-8045 京都府 京都市 南区東九条西明田
町 5 7 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP). 黒坂 啓介
(KUROSAKA, Keisuke) [JP/JP]; 〒611-0021 京都府 宇

治市 宇治小桜 2 3 番地 ユニチカ株式会社中央研究
所内 Kyoto (JP). 川瀬 至道 (KAWASE, Shido) [JP/JP];
〒611-0021 京都府 宇治市 宇治小桜 2 3 番地 ユニチ
カ株式会社中央研究所内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 吉田 稔, 外 (YOSHIDA, Minoru et al.); 〒
543-0014 大阪府 大阪市 天王寺区 玉造元町 2 番
3 2-1 3 0 1 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING GLUCOSE DEHYDROGENASES

(54) 発明の名称: グルコース脱水素酵素の製造方法

(57) Abstract: A process for producing glucose dehydrogenases. This process comprises transferring a DNA containing a sequence represented by SEQ ID NO:1 which encodes an α subunit having a glucose dehydrogenase activity and a β subunit being an electron transfer protein into a microorganism belonging to the genus *Pseudomonas* to thereby construct a transformant, and culturing this transformant so as to allow the production of a first glucose dehydrogenase containing the above-described β subunit and a second glucose dehydrogenase free from the β subunit. The α subunit as described above has a molecular weight of about 60 kDa measured by, for example, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions, while the β subunit as described above has a molecular weight of about 43 kDa measured by, for example, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions.

(57) 要約: 本発明は、グルコース脱水素酵素の製造方法に関する。この製造方法は、配列番号 1 に記載するグルコース脱水素活性を有する α サブユニットおよび電子伝達タンパク質である β サブユニットをコードする配列を含む DNA を、シュードモナス属に属する微生物に導入して形質転換体を形成し、この形質転換体を培養して、前記 β サブユニットを含む第 1 のグルコース脱水素酵素と、前記 β サブユニットを含まない第 2 のグルコース脱水素酵素とを産生させるものである。前記 α サブユニットは、たとえば還元条件下での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約 60 kDa であり、前記 β サブユニットは、たとえば還元条件下での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約 43 kDa である。

明 細 書

グルコース脱水素酵素の製造方法

5 技術分野

本発明は、グルコース脱水素酵素の製造方法に関する。この製造方法により得られるグルコース脱水素酵素は、グルコースセンサに好適に使用できるものである。

10 背景技術

特定の基質に対して特異的に反応する酵素を用いたバイオセンサの開発は、産業の分野を問わず盛んに行われている。バイオセンサの代表的なものとしては、主に医療分野で使用されるグルコースセンサが挙げられる。

- グルコースセンサは、酵素と電子伝達物質を含む反応系を構築するためのもの
- 15 であり、このグルコースセンサを利用する場合には、たとえばアンペロメトリックな手法を用いてグルコースが定量される。酵素としては、グルコースオキシダーゼ (GOD) やグルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) が使用されている (日本国特開 2002-65778号公報)。

- GODは、グルコースに対する基質特異性が高く、熱安定性に優れており、酵素の
- 20 量産化が可能であるために生産コストが他の酵素と比べて安価であるといった利点がある。その反面、GODを使用した系は、測定サンプル中の溶存酸素の影響を受けやすいため、溶存酸素が測定結果に影響を及ぼすといった問題がある。

- 一方、GDHを使用した系は、測定サンプル中の溶存酸素の影響を受けにくい。このため、GDHを使用した系は、酸素分圧が低い環境下で測定を行ったり、酸素量が多
- 25 多く要求される高濃度サンプルを測定する場合であっても、精度よくグルコース濃度を測定することができる。その反面、GDHは、熱安定性が悪く、基質特異性が GOD よりも劣るといった問題点がある。

このような事情から、GODとGDHの双方の欠点を補う酵素が模索されていた。本発明者の一人である早出は、国際公開W002/36779号公報に開示されているように、

温泉付近の土壌から新規菌株(ブルクホルデリア・セパシアKS1株)を分離し、この菌株から新しいGDHを取得した。このGDHは、 α 、 β 、 γ サブユニットからなるものであり(以下「CyGDH」という)、電子伝達物質との反応速度が高く、耐熱性の面でも問題がないものであり、グルコースセンサ用の酵素としては好適なものであった。

- 5 しかしながら、KS1株では、CyGDHの生産性が悪いため、工業的な応用を考えた場合にはKS1株によるCyGDHの量産化は困難である。そこで、本発明者らは、 α 、 β 、 γ サブユニットをコードするDNAを大腸菌に導入して発現させたところ、効率良くGDHが産生された。ところが、このGDHは、 α 、 γ サブユニットからなるものであり、 β サブユニットが欠落したものであった(以下「 α GDH」という)。このように、
- 10 大腸菌を形質転換する方法では、 α 、 β 、 γ サブユニットの全てを発現させることができなかった。

- 本発明者らはさらに、 α GDHの特性について調べたところ、 α GDHは、CyGDHに比べて電子伝達物質との反応速度が小さいものの、CyGDHよりも耐熱性が高く、グルコースに対する K_m が小さいものであった。つまり、 α GDHは、CyGDHと同様に、
- 15 グルコースセンサ用の酵素として有用なものであることが確認された。

従来、このように有用な酵素2種を製造する際には、発現菌株の取得、培養および精製を、それぞれ別個に行う必要があり、製造コスト、効率の面で不利であった。

20 発明の開示

本発明は、たとえばグルコースセンサなどに応用し得る2種類のGDHを効率良く製造することを目的としている。

- 本発明に係るグルコース脱水素酵素の製造方法は、配列番号1に記載するグルコース脱水素活性を有する α サブユニットおよび電子伝達タンパク質である β サブ
- 25 ユニットをコードする配列を含むDNAを、シュードモナス属に属する微生物に導入して形質転換体を形成し、この形質転換体を培養して、前記 β サブユニットを含む第1のグルコース脱水素酵素と、前記 β サブユニットを含まない第2のグルコース脱水素酵素とを産生させることを特徴としている。

前記 α サブユニットは、たとえば還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約60kDaである。一方、前記 β サブユニットは、たとえば還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約43kDaである。

- 5 前記DNAは、還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約14kDaである γ サブユニットをコードする塩基配列を含んでいてもよい。この場合、前記第1および第2のグルコース脱水素酵素は、前記 γ サブユニットを含んだものとして産生される。

- 10 前記シュードモナス属に属する微生物としては、シュードモナス・プチダ、シュードモナス・フルオレッセンシス、シュードモナス・アエルギノーサなどが挙げられるが、組み換え体の安全性の面からシュードモナス・プチダを使用するのが好ましい。

- 15 前記DNAは、たとえばブルクホルデリア属に属する微生物であって、グルコース脱水素活性を有する酵素を産生する能力を有する微生物から取得することができる。本発明で採用されるブルクホルデリア属に属する微生物は、本酵素の生産能力を有するブルクホルデリア属に属する微生物であれば特に制限されないが、ブルクホルデリア・セパシア、特にブルクホルデリア・セパシアKS1株(以下、単に「KS1株」という)が好ましい。

- 20 このKS1株は、早出が 温泉付近の土壌から分離した新規菌株であり、その菌学的性質からブルクホルデリア・セパシアと同定され、KS1株と命名された。このKS1株は、平成12年9月25日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に微生物受託番号第FERM BP-7306として寄託されている。

- 25 なお、本発明者らはKS1株以外の株について、財団法人発酵研究所(Institute for Fermentation, Osaka, IF0)又は理化学研究所微生物系統保存施設(Japan Collection of Microorganisms, JCM)に寄託されている同ブルクホルデリア・セパシアのいくつかの菌株を取り寄せてグルコース脱水素酵素活性を測定したところ、いずれの菌株にも活性があることを確認している。したがって、本発明で使用するDNAを取得するための微生物としては、KS1株以外のブルクホルデリア・

セパシア、たとえばJCM5506, JCM5507, JCM2800, JCM2801, IF015124, IF014595を採用できる。

前記DNAは、ブルクホルデリア・セパシア染色体のDNAから単離されるが、その塩基配列及び同塩基配列によってコードされるアミノ酸配列が明らかとされているので、これらの配列に基づいて化学合成することによっても取得することができる。

前記 α サブユニットとしては、たとえば配列番号3のアミノ酸配列、または配列番号3のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を有しているものが採用される。この α サブユニットは、たとえば配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号764～2380からなる塩基配列によりコードされる。したがって、本発明で使用するDNAとしては、上記塩基配列を有するものを使用するのが好ましい。

前記 β サブユニットとしては、たとえば配列番号5のアミノ酸配列、または配列番号5のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を有しているものが採用される。この β サブユニットは、たとえば配列番号1のうち、塩基番号2386～3660の塩基配列によりコードされる。したがって、本発明で使用するDNAとしては、上記塩基配列を有するものを使用するのが好ましい。

前記 γ サブユニットを α サブユニットとともに発現させると、 α サブユニットのみを発現させた場合に比べて高い酵素活性が得られることが早出によって確認されている。したがって、酵素活性の観点からは、 γ サブユニットを発現させるのが好ましく、前記DNAにおいては、 γ サブユニットをコードする塩基配列は、 α サブユニットをコードする塩基配列の上流域に含ませるのが好ましい。そうすれば、 α サブユニットを産生する際に、先ず γ サブユニットが発現されてタンパク質として存在することにより微生物体内で効率良く α サブユニットを産生することができると考えられる。

前記 γ サブユニットとしては、たとえば配列番号2のアミノ酸配列、または配列番号2のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を有しているものが採用される。この γ サブユニッ

トは、たとえば配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号258～761からなる塩基配列によりコードされる。したがって、本発明で使用するDNAとしては、上記塩基配列を有するものを使用するのが好ましい。

- 5 配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号2386以降の塩基配列は、 β サブユニットをコードしていると推定されるが、塩基番号2386～2451の塩基配列は、 β サブユニットのシグナルペプチドをコードしていると推測される。同シグナルペプチドの推定されるアミノ酸配列は、配列番号4のアミノ酸番号1～22のアミノ酸配列である。

- 10 シグナルペプチドは、リボソームで合成されたタンパク質が内膜を通過してペリプラズム空間に分泌される際に必要なペプチドであるため、シグナルペプチドが存在すれば、菌体のペリプラズムもしくは培養上清中に含有するタンパク質量が増加する。したがって、前記DNAとしては、前記 β サブユニットのシグナルペプチドの発現をコードする塩基配列を含んでいるものを使用するのが好ましい。

15 図面の簡単な説明

図1は、形質転換体から取得した可溶化フラクションのQ-SepharoseFFクロマトグラフィーの結果を示すものである。

図2は、SDS-PAGEの結果を示したものである。

20 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明に係るグルコース脱水素酵素の製造方法について、具体的に説明する。

- 25 本製造方法では、たとえば α サブユニットおよび β サブユニットの発現をコードするDNAを取得する第1工程と、このDNAを含む組み換えベクターを、シュードモナス属に属する微生物に導入して形質転換体を形成する第2工程と、この形質転換体を培地にて培養し、 β サブユニットを含むグルコース脱水素酵素(たとえばCyGDH)と、 β サブユニットを含まないグルコース脱水素酵素(たとえば α GDH)と産生させる第3工程と、培地または微生物からグルコース脱水素酵素を採取する第4工程と、を含んでいる。

〈第1工程(DNAの取得)〉

- DNAの取得にあたっては、まず組み換えベクターを構築する。組み換えベクターは、ブルクホルデリア属に属する微生物(たとえばブルクホルデリア・セパシアKS1株)から染色体DNAを分離・精製した後、この染色体DNAを切断した染色体DNA断片
- 5 またはPCRなどにより増幅させたDNA断片と、リニアな発現ベクターとを結合閉鎖させることにより構築される。

- 染色体DNAの分離・精製は、微生物を溶菌して得られる溶菌物に基づいて行われる。溶菌の方法としては、たとえばリゾチームなどの溶菌酵素により処理が挙げられ、この処理に加えて、必要に応じてプロテアーゼや他の酵素やラウリル硫酸
- 10 ナトリウム(SDS)などの界面活性剤が併用される。さらに、凍結融解やフレンチプレス処理のような物理的破碎方法とを組み合わせてもよい。一方、溶菌物からのDNAの分離・精製は、たとえばフェノール処理やプロテアーゼ処理による除蛋白処理、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈殿処理などの方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。

- 15 染色体DNAの切断は、常法にしたがい、たとえば超音波処理や制限酵素処理を用いて行うことができる。制限酵素としては、たとえば特定のヌクレオチド配列に作用するII型制限酵素を用いられる。

染色体DNA断片と発現ベクターとの結合は、たとえばDNAリガーゼを用いて行われる。

- 20 発現ベクターとしては、宿主微生物内で自律的に増殖し得るファージまたはプラスミドから遺伝子組み換え用として構築されたものが適している。ファージとしては、たとえば後述するエシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、Lambda gt10, Lambda gt11などが例示される。一方、プラスミドとしては、たとえば、エシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、pBR322, pUC18, pUC118,
- 25 pUC19, pUC119, pTrc99A, pBluescriptあるいはコスミドであるSuperCosIなどが例示される。また、シュードモナスを用いる場合には、グラム陰性菌用広宿主域ベクターであるRSF1010, pBBR122, pCN51などが例示される。

次いで、組み換えベクターにマーカーを施して、この組み換えベクターを宿主微生物に移入して形質転換体を形成する。この形質転換体から、ベクターのマー

カーと酵素活性の発現を指標としてスクリーニングして、GDHをコードする遺伝子を含む組換えベクターを保持する遺伝子供与微生物を得る。

宿主微生物としては、組換えベクターが安定であり、かつ自律増殖可能で外来性遺伝子の形質を発現できるのであれば特に制限されない。一般的には、エシェリヒア・コリDH5 α , XL-1BlueMRなどを用いることができる。宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、たとえば宿主微生物がエシェリヒア・コリの場合には、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポレーション法などを用いることができる。

さらに、遺伝子供与微生物を培養して、この微生物から組換えベクターを分離・精製した後、組換えベクターからGDHをコードする遺伝子(クローン化断片)を採取する。クローン化断片の採取は、染色体DNAを採取するのと同様な手法により行うことができる。

このクローン化断片は、グルコース脱水素活性を有する α サブユニットと、電子伝達タンパク質である β サブユニットをコードする塩基配列を有している。ブルクホルデリア・セパシアKS1株から目的DNAを得る場合には、クローン化断片は、 α サブユニットや β サブユニット(β サブユニットのシグナルペプチドを含む)をコードする塩基配列に加えて、 γ サブユニットをコードする塩基配列を含むものとして得られる。なお、クローン化断片が α サブユニットや β サブユニットをコードしていることは、あるいは γ サブユニットをコードしていることは、このクローン化断片の塩基配列を常法により解読することによって確認することができる。

〈第2工程(形質転換体の形成)〉

目的とするDNAを含む組換えベクターは、第1工程において得られたクローン化断片をベクターに組み込んだ後、シュードモナス属に属する微生物に導入することにより形成される。シュードモナス属に属する微生物としては、たとえばシュードモナス・プチダが好ましく使用される。宿主微生物への組換えベクターの導入方法は、第1工程におけるスクリーニングの際の形質転換体の形成と同様な手法により行うことができる。

〈第3工程(形質転換体の培養およびGDHの産生)〉

第2工程において得られた形質転換体は、GDHを産生させるべく培養される。この形質転換体からは、 β サブユニットを含むGDHと β サブユニットを含まないGDHが同時に産生される。たとえば、ブルクホルデリア・セパシアKS1株から目的とするDNAを得た場合には、 α , β , γ サブユニットを有するCyGDHと、 α , γ サブユニットを有する α GDHとが同時に産生される。

形質転換体の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。

10 培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては、資化可能な炭素化合物であればよく、たとえばグルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。窒素源としては、資化可能な窒素化合物であればよく、たとえばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。

15 他に、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

培養温度は、形質転換体が生育し、形質転換体がGDHを産生する範囲で適宜変更し得るが、好ましくは20~42°C程度である。培養は、GDHが最高収量に達する時期

20 を見計らって適當時期に完了すればよく、通常は培養時間が12~72時間程度とされる。培地のpHは、形質転換体が発育し、形質転換体がGDHを産生する範囲で適宜変更し得るが、好ましくはpH5.0~9.0程度の範囲である。

〈第4工程(GDHの採取)〉

GDHの採取は、一般には、常法に従って、培養液や形質転換体からGDH含有溶液

25 を分離した後、このGDH含有溶液を精製することにより行われる。

GDH含有溶液は、GDHが菌体内に存在する場合には、ろ過または遠心分離などの手段により培養液から菌体を採取した後、この菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的で破壊し、必要に応じてEDTAなどのキレート剤及び界面活性剤を添加してGDHを可溶化することにより得ることができる。一方、GDHが菌体外

(培養液中)に存在する場合には、ろ過または遠心分離などの手段により培養液と菌体とを分離することにより得ることができる。

- GDH含有溶液の精製は、この溶液から直ちに行うこともできるが、この溶液中のGDHを濃縮した後に行うこともできる。濃縮は、たとえば減圧濃縮、膜濃縮、塩析処理、あるいは親水性有機溶媒(たとえばメタノール、エタノール、アセトン)による分別沈殿法により行うことができる。GDHの濃縮には、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。濃縮液の精製は、たとえばゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーを適宜組み合わせることによって行うことができる。これにより、 β サブユニットを含むGDHと β サブユニットを含まないGDHとを個別に得ることができる。

このようにして得られた精製酵素は、たとえば凍結乾燥、真空乾燥、スプレードライにより粉末化して市場に流通させることができる。

実施例

- 以下においては、上述した製造方法の具体的な例について説明するとともに、この例により2種類のGDHが得られることについて実証する。

〈ブルクホルデリア・セパシアKS1株からの染色体DNAの調製〉

- ブルクホルデリア・セパシアKS1株からの染色体DNAは、常法に従って調製した。すなわち、まず、KS1株をTL液体培地(ポリペプトン=10g、酵母抽出液=1g、NaCl=5g、 KH_2PO_4 =2g、グルコース=5g；全量1L、pH 7.2)を用いて、34°Cで一晩振盪した。増殖した菌体は、遠心分離機により回収した。この菌体を10mM NaCl、20mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mM EDTA、0.5% SDS、100 $\mu\text{g/mL}$ のプロテインゼンKを含む溶液に懸濁し、50°Cで6時間処理した。この懸濁液に等量のフェノールクロロホルムを加えて室温で10分間攪拌した後、遠心分離機により上清を回収した。これに終濃度0.3Mになるように酢酸ナトリウムを加え、2倍量のエタノールを重層して中間層に染色体DNAを析出させた。析出物をガラス棒を用いてすくいとり、70%エタノールで洗浄した後、適当量のTEバッファーに溶解させ、染色体DNA溶液とした。

〈形質転換体の形成〉

- 先に得た染色体DNAを鋳型として、PCR法によりGDHをコードする遺伝子全長を増幅した。プライマーは、GDHの γ サブユニットのN末端部の配列、およびGDHの β サブユニットのC末端部の配列を用いた。このDNA断片を各プライマーの端に位置する制限酵素認識部位で切断した断片、およびtrcプロモータを含むDNA断片を調整し、広宿主域ベクターRSF1010と結合した後、大腸菌JM109に導入し、ストレプトマイシン $50 \mu\text{g/ml}$ を含むLB寒天培地でコロニーを形成させた。生じたコロニーからプラスミドを調整し、これを鋳型として、前記PCRプライマーを用いたPCRによって、約3.4Kbの断片が増幅されるクローンを選択し、これを、シュードモナス・プチダATCC47054株に導入することにより、目的とする形質転換体(GDH発現菌株)を得た。

〈形質転換体の培養およびGDHの産生〉

- 形質転換体の培養は、好氣的培養条件で行った。より具体的には、形質転換体の培養は、培養液1L当たりの組成が表1となるように調整された培地7Lを用いて、 34°C で8時間行った。本培養液7Lを $9,000 \times g$ (4°C 、10分間)で遠心分離することにより菌体を得た。

表 1 : 培地組成

ポリペプトン	10 g
酵母抽出液	1 g
NaCl	5 g
KH_2PO_4	2 g
グルコース	5 g
Einol (ABLE Co. 東京 日本)	0.14 g
Total、蒸留水	1 L
pH 調製	7.2

20 〈GDHの精製〉

得られた菌体を10mMのリン酸カリウム緩衝液(pH6.0)に分散させた状態で、フレンチプレス(大竹製作所 東京 日本)で $1,500\text{Kg/cm}^2$ の圧力差を加えて破壊した。このときに得られた細胞抽出液を $8,000 \times g$ で10分間、遠心分離し、細胞固形物を

除いて粗酵素溶液を得た。

粗酵素溶液は、最終濃度が1%になるようにTriton-X100を添加した。そして、4℃で一晩ゆっくり攪拌した。次に超遠心(4℃、69800×g、90分間)した後に再遠心(4℃、15000×g、15分間)し、上清として可溶化フラクションを得た。

- 5 その可溶化フラクションを0.2%Triton-X100を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)で透析した後、その溶液を、0.2%Triton-X100を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)で等量化されたQ-SepharoseFFカラム(22mmID×20cm アマシャム バイオサイエンス)に供給した。タンパク質は、10mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)中のNaClの濃度が0～500mMになるように、直線的グラジエントで溶出させた。その流速は5mL/minで行った。

溶出液については、各フラクション毎にGDH活性を測定した。その結果を、図1に模式的に表した。図1から分かるように、グラジエントをかけた範囲において2つの大きなピークが確認された。

- 15 GDHの活性測定は、グルコースの脱水素化に基づく、電子受容体の還元反応を追跡することにより行った。電子受容体としては、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)およびフェナンジメトサルフェート(PMS)を用いた。反応はポリエチレンチューブ内で所定の温度で実施した。

- 20 まず、0.75mM PMSと0.75mM DCIP含有25mMトリスHCl緩衝液(pH8.0)20μLに酵素溶液5μLを添加して混合液を準備した。この混合液は、事前に1分間定温放置した。混合液に2M グルコース1μL(最終濃度:77mM)を添加して反応を開始させ、2分間定温放置した。次に、氷冷蒸留水100μLまたは7.5M 尿素120μLを添加して試料を冷却した。この試料について、超微量計測用セル(100μL)およびこれを用いて計測できる分光光度計(UV160、島津製作所、京都、日本)を用いて、DCIP還元にもとづく退色を経時的に計測した。測定波長は、DCIPの吸収波長である600nmとした。DCIPのモル吸光係数は $22.23\text{mM} \times \text{cm}^{-1}$ とした。酵素1単位(U)は標準検定条件下で1分ごとに1μM グルコースを酸化する量と定義した。タンパク濃度はローリー法で測定した。

次いで、2つのGDH活性のピークについて、フラクションを別個に集め、0.2% Triton-X100を含む10mM リン酸カリウム緩衝液(pH8.0、4℃)で一夜透析し、2種類

のGDH溶液を調整した。

各々のGDH調整溶液について、DEAE-5PWカラム (8.0mmID×7.5cm 東ソー、東京、日本)を用いて別個に精製した。カラムは、予め、0.2%Triton-X100を含む10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH8.0) で平衡化しておいた。タンパク質は、10mMリン酸カリウム緩衝液 (pH8.0) 中のNaClの濃度が0~400mMになるようし、直線的グラジエントで、流速1mL/minで溶出させた。各々のクロマトグラフィーにおけるGDH活性が最も高いフラクションを集め、0.2%Triton-X100を含む10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH8.0) で、一夜脱塩し、2種類の精製酵素(以下、便宜上、「第1精製酵素」および「第2精製酵素」という)を得た。

10 〈精製酵素のサブユニットの特定〉

各精製酵素液をSDS-PAGEで電気泳動し、サブユニットの分子量を特定した。SDS-PAGEはTris-Tricine緩衝液を用いて8-25%ポリアクリルアミドの勾配ゲル中で実施した。そのゲルのタンパク質はクマシー染色を行った。Phast System(Pharmacia)により、分離と展開を自動的に行った。標準タンパクの相対移動度により分子質量を測定した。

SDS-PAGE電気泳動の結果を図2に示した。図2においては、レーン1は分子量標準マーカータンパク質のクマシー染色を、レーン2は第1精製酵素のクマシー染色を、レーン3は第2精製酵素のクマシー染色をそれぞれ示している。同図から分かるように、第1精製酵素は、分子量が約60kDa、約43kDa、および約14kDaのタンパク質に分離した。したがって、第1精製酵素は、分子量が約60kDaの α サブユニットと、分子量が約43kDaの β サブユニットと、分子量が約14kDaの γ サブユニットとが結合していることが示唆された。第2精製酵素は、分子量が約60kDa、および約14kDaのタンパク質に分離した。したがって、第2精製酵素は、分子量が約60kDaの α サブユニットと、分子量が約14kDaの γ サブユニットとが結合していることが示唆された。SDS-PAGE電気泳動の結果は、第1精製酵素と第2精製酵素とが異なるGDHであり、2種類のGDHが同時に生成されたことを示している。

電気泳動によって得られた α サブユニット、 β サブユニットを含むバンドをそれぞれ切り取り、ポリビニリデンフルオリド膜に転写した後、アミノ酸シーケンサー(島津製作所製、PPSQ-10)によりアミノ酸配列を解析した。

α サブユニットについては、配列番号3のアミノ酸配列においてアミノ酸番号2～12からなる11残基から構成されるペプチド配列を含むことが確認された。一方、 β サブユニットについては、配列番号5に示すN末端の16残基のアミノ酸配列を確認することができた。

5 〈組み換えベクターの分析〉

GDH活性を有するシュードモナス・プチダの形質転換体から、目的組み換えベクターを抽出した。この組み換えベクターの挿入DNA断片について、常法により塩基配列を決定した。その結果、配列番号258～3660の塩基配列を含んでいた。

国際公開W002/36779号公報などに開示されているように、 α サブユニットをコードする塩基配列は、配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号764～2380、 β サブユニットをコードする塩基配列は、配列番号1のうち、塩基番号2386～3660、 γ サブユニットをコードする塩基配列は、配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号258～761、 β サブユニットのシグナルペプチドをコードする塩基配列は、配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号2386～2451の塩基配列である。

したがって、目的組み換えベクターは、 α サブユニット、 β サブユニット(β サブユニットのシグナルペプチドを含む)、 γ サブユニットをコードする塩基配列を含んでいることが確認された。なお、各塩基配列に対応するアミノ酸配列は、 α サブユニットについては配列番号3、 β サブユニットについては配列番号5、 γ サブユニットについては配列番号2、 β サブユニットのシグナルペプチドについては配列番号4のアミノ酸配列のうちアミノ酸番号1～22に示してある。

以上のことから分かるように、本発明では、たとえば α GDHとC γ GDHといったように、2種類のGDHを同時に、しかも効率よく製造することができる。

請 求 の 範 囲

1. 配列番号 1 に記載するグルコース脱水素活性を有する α サブユニットおよび電子伝達タンパク質である β サブユニットをコードする配列を含む DNA を、シュードモナス属に属する微生物に導入して形質転換体を形成し、この形質転換体を培養して、前記 β サブユニットを含む第 1 のグルコース脱水素酵素と、前記 β サブユニットを含まない第 2 のグルコース脱水素酵素とを産生させる、グルコース脱水素酵素の製造方法。
- 10 2. 前記 α サブユニットは、還元条件下での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約 60kDa であり、
前記 β サブユニットは、還元条件下での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約 43kDa である、請求項 1 に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。
- 15 3. 前記 DNA は、還元条件下での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約 14kDa である γ サブユニットをコードする塩基配列を含んでおり、
前記第 1 および第 2 グルコース脱水素酵素は、前記 γ サブユニットを含むものとして産生される、請求項 1 に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。
- 20 4. 前記シュードモナス属に属する微生物は、シュードモナス・プチダである、請求項 1 に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。
5. 前記 DNA は、ブルクホルデリア属に属する微生物であって、グルコース脱水素
25 酵素を産生する能力を有する微生物から取得したものである、請求項 1 に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。
6. 前記ブルクホルデリア属に属する微生物は、ブルクホルデリア・セパシア KS1 株 (FERM BP-7306) である、請求項 5 に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

7. 前記 α サブユニットは、配列番号3のアミノ酸配列、または配列番号3のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を有している、請求項1に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

5

8. 前記DNAは、配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号764～2380からなる α サブユニットをコードする塩基配列を含んでいる、請求項7に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

10

9. 前記 β サブユニットは、配列番号5のアミノ酸配列、または配列番号5のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を有している、請求項1に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

15

10. 前記DNAは、配列番号1のうち、塩基番号2386～3660からなる β サブユニットをコードする塩基配列を含んでいる、請求項9に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

20

11. 前記 γ サブユニットは、配列番号2のアミノ酸配列、または配列番号2のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を有している、請求項3に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

25

12. 前記DNAは、配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号258～761からなる γ サブユニットをコードする塩基配列を含んでいる、請求項11に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

13. 前記DNAは、 γ サブユニットをコードする塩基配列を、 α サブユニットをコードする塩基配列よりも上流域に含んでいる、請求項12に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。
- 5 14. 前記DNAは、前記 β サブユニットのシグナルペプチドをコードする塩基配列を含んでいる、請求項1に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。
15. 前記シグナルペプチドは、配列番号4のアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号1～22のアミノ酸配列を有している、請求項15に記載のグルコース脱水素酵素の
- 10 製造方法。
16. 前記シグナルペプチドは、配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号2386～2451の塩基配列によりコードされる、請求項15に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

FIG. 1

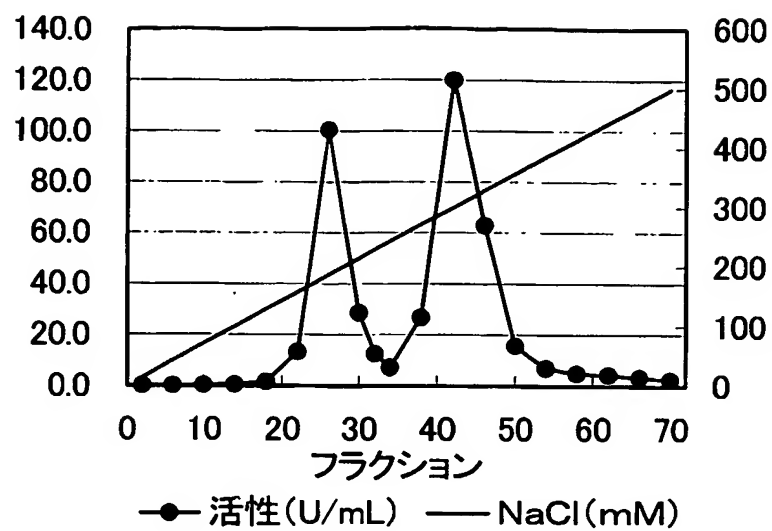
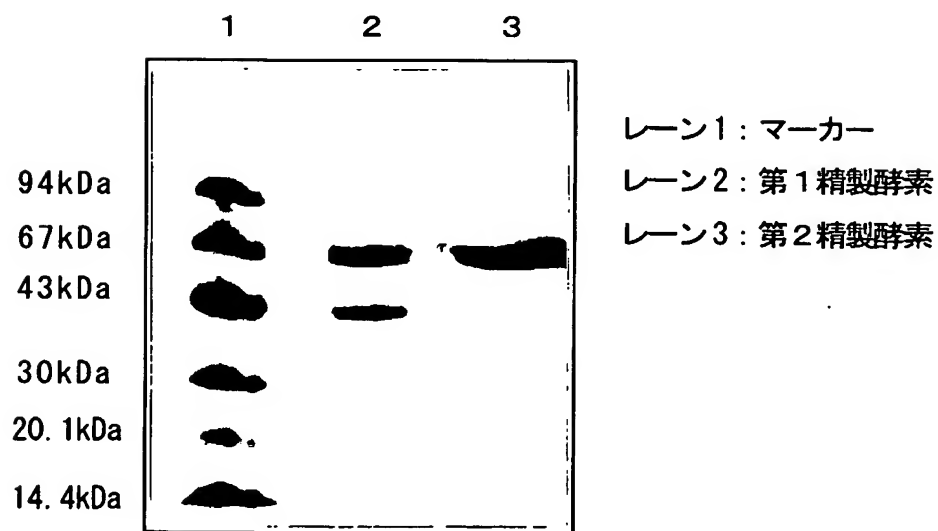


FIG. 2



配 列 表

SEQUENCE LISTING

- <110> SODE, Koji; ARKRAY, Inc.; UNITIKA LTD.
- 5
- <120> グルコース脱水素酵素の製造方法
- <130> WO-AR2003-7
- 10
- <150> JP 2002/253752
- <151> 2002-8-30
- <160> 5
- 15
- <210> 1
- <211> 3706
- <212> DNA
- <213> Burkholderia cepacia
- 20
- <220>
- <221> CDS
- <222> (258).. (761)
- <220>
- 25
- <221> CDS
- <222> (764).. (2380)
- <220>
- <221> CDS

<222> (2386).. (3660)

<400> 1

```

aagctttctg tttgattgca cgcgattcta accgagcgtc tgtgaggcgg aacgcgacat 60
5 gcttcgtgtc gcacacgtgt cgcgccgacg acacaaaaat gcagcgaaat ggctgatcgt 120
tacgaatggc tgacacattg aatggactat aaaaccattg tccgttccgg aatgtgcgcg 180
tacatttcag gtccgcgccg atttttgaga aatatcaagc gtggttttcc cgaatccggt 240
gttcgagaga aggaaac atg cac aac gac aac act ccc cac tcg cgt cgc 290

Met His Asn Asp Asn Thr Pro His Ser Arg Arg
10 1 5 10
cac ggc gac gca gcc gca tca ggc atc acg cgg cgt caa tgg ttg caa 338
His Gly Asp Ala Ala Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln
15 15 20 25
ggc gcg ctg gcg ctg acc gca gcg ggc ctc acg ggt tcg ctg aca ttg 386
Gly Ala Leu Ala Leu Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu
30 35 40
cgg gcg ctt gca gac aac ccc ggc act gcg ccg ctc gat acg ttc atg 434
Arg Ala Leu Ala Asp Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met
45 50 55
20 acg ctt tcc gaa tcg ctg acc ggc aag aaa ggg ctc agc cgc gtg atc 482
Thr Leu Ser Glu Ser Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile
60 65 70 75
ggc gag cgc ctg ctg cag gcg ctg cag aag ggc tcg ttc aag acg gcc 530
Gly Glu Arg Leu Leu Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala
25 80 85 90
gac agc ctg ccg cag ctc gcc ggc gcg ctc gcg tcc ggt tcg ctg acg 578
Asp Ser Leu Pro Gln Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr
95 100 105
cct gaa cag gaa tcg ctc gca ctg acg atc ctc gag gcc tgg tat ctc 626

```

Pro Glu Gln Glu Ser Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu
 110 115 120
 ggc atc gtc gac aac gtc gtg att acg tac gag gaa gca tta atg ttc 674
 Gly Ile Val Asp Asn Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe
 5 125 130 135
 ggc gtc gtg tcc gat acg ctc gtg atc cgt tcg tat tgc ccc aac aaa 722
 Gly Val Val Ser Asp Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys
 140 145 150 155
 ccc ggc ttc tgg gcc gac aaa ccg atc gag agg caa gcc tg atg gcc 769
 10 Pro Gly Phe Trp Ala Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala Met Ala
 160 165 170
 gat acc gat acg caa aag gcc gac gtc gtc gtc gtt gga tcg ggt gtc 817
 Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser Gly Val
 175 180 185
 15 gcg ggc gcg atc gtc gcg cat cag ctc gcg atg gcg ggc aag gcg gtg 865
 Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys Ala Val
 190 195 200
 atc ctg ctc gaa gcg ggc ccg cgc atg ccg cgc tgg gaa atc gtc gag 913
 Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile Val Glu
 20 205 210 215
 cgc ttc cgc aat cag ccc gac aag atg gac ttc atg gcg ccg tac ccg 961
 Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro Tyr Pro
 220 225 230
 tcg agc ccc tgg gcg ccg cat ccc gag tac ggc ccg ccg aac gac tac 1009
 25 Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn Asp Tyr
 235 240 245 250
 ctg atc ctg aag ggc gag cac aag ttc aac tcg cag tac atc cgc gcg 1057
 Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile Arg Ala
 255 260 265

	gtg ggc ggc acg acg tgg cac tgg gcc gcg tcg gcg tgg cgc ttc att	1105
	Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg Phe Ile	
	270 275 280	
	ccg aac gac ttc aag atg aag agc gtg tac ggc gtc ggc cgc gac tgg	1153
5	Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg Asp Trp	
	285 290 295	
	ccg atc cag tac gac gat ctc gag ccg tac tat cag cgc gcg gag gaa	1201
	Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala Glu Glu	
	300 305 310	
10	gag ctc ggc gtg tgg ggc ccg ggc ccc gag gaa gat ctg tac tcg ccg	1249
	Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr Ser Pro	
	315 320 325 330	
	cgc aag cag ccg tat ccg atg ccg ccg ctg ccg ttg tcg ttc aac gag	1297
	Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe Asn Glu	
15	335 340 345	
	cag acc atc aag acg gcg ctg aac aac tac gat ccg aag ttc cat gtc	1345
	Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe His Val	
	350 355 360	
	gtg acc gag ccg gtc gcg cgc aac agc cgc ccg tac gac ggc cgc ccg	1393
20	Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly Arg Pro	
	365 370 375	
	act tgt tgc ggc aac aac aac tgc atg ccg atc tgc ccg atc ggc gcg	1441
	Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile Gly Ala	
	380 385 390	
25	atg tac aac ggc atc gtg cac gtc gag aag gcc gaa cgc gcc ggc gcg	1489
	Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala Gly Ala	
	395 400 405 410	
	aag ctg atc gag aac gcg gtc gtc tac aag ctc gag acg ggc ccg gac	1537
	Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly Pro Asp	

	415	420	425	
	aag cgc atc gtc gcg gcg ctc tac aag gac aag acg ggc gcc gag cat			1585
	Lys Arg Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala Glu His			
	430	435	440	
5	cgc gtc gaa ggc aag tat ttc gtg ctc gcc gcg aac ggc atc gag acg			1633
	Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile Glu Thr			
	445	450	455	
	ccg aag atc ctg ctg atg tcc gcg aac cgc gat ttc ccg aac ggt gtc			1681
	Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn Gly Val			
10	460	465	470	
	gcg aac agc tcg gac atg gtc ggc cgc aac ctg atg gac cat ccg ggc			1729
	Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His Pro Gly			
	475	480	485	490
	acc ggc gtg tcg ttc tat gcg agc gag aag ctg tgg ccg ggc cgc ggc			1777
15	Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly Arg Gly			
	495	500	505	
	ccg cag gag atg acg tcg ctg atc ggt ttc cgc gac ggt ccg ttc cgc			1825
	Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro Phe Arg			
	510	515	520	
20	gcg acc gaa gcg gcg aag aag atc cac ctg tcg aac ctg tcg cgc atc			1873
	Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser Arg Ile			
	525	530	535	
	gac cag gag acg cag aag atc ttc aag gcc ggc aag ctg atg aag ccc			1921
	Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met Lys Pro			
25	540	545	550	
	gac gag ctc gac gcg cag atc cgc gac cgt tcc gca cgc tac gtg cag			1969
	Asp Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr Val Gln			
	555	560	565	570
	ttc gac tgc ttc cac gaa atc ctg ccg caa ccc gag aac cgc atc gtg			2017

Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg Ile Val
 575 580 585
 ccg agc aag acg gcg acc gat gcg atc ggc att ccg cgc ccc gag atc 2065
 Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro Glu Ile
 5 590 595 600
 acg tat gcg atc gac gac tac gtg aag cgc ggc gcc gcg cat acg cgc 2113
 Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His Thr Arg
 605 610 615
 gag gtc tac gcg acc gcc gcg aag gtg ctc ggc ggc acg gac gtc gtg 2161
 10 Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp Val Val
 620 625 630
 ttc aac gac gaa ttc gcg ccg aac aat cac atc acg ggc tcg acg atc 2209
 Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ser Thr Ile
 635 640 645 650
 15 atg ggc gcc gat gcg cgc gac tcc gtc gtc gac aag gac tgc cgc acg 2257
 Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys Arg Thr
 655 660 665
 ttc gac cat ccg aac ctg ttc att tcg agc agc gcg acg atg ccg acc 2305
 Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ala Thr Met Pro Thr
 20 670 675 680
 gtc ggt acc gta aac gtg acg ctg acg atc gcc gcg ctc gcg ctg cgg 2353
 Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala Leu Arg
 685 690 695
 atg tcg gac acg ctg aag aag gaa gtc tgacc gtg cgg aaa tct act ctc 2403
 25 Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val Val Arg Lys Ser Thr Leu
 700 705 710
 act ttc ctc atc gcc ggc tgc ctc gcg ttg ccg ggc ttc gcg cgc gcg 2451
 Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu Pro Gly Phe Ala Arg Ala
 715 720 725

gcc gat gcg gcc gat ccg gcg ctg gtc aag cgc ggc gaa tac ctc gcg 2499
 Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala
 730 735 740 745
 acc gcc atg ccg gta ccg atg ctc ggc aag atc tac acg agc aac atc 2547
 5 Thr Ala Met Pro Val Pro Met Leu Gly Lys Ile Tyr Thr Ser Asn Ile
 750 755 760
 acg ccc gat ccc gat acg ggc gac tgc atg gcc tgc cac acc gtg aag 2595
 Thr Pro Asp Pro Asp Thr Gly Asp Cys Met Ala Cys His Thr Val Lys
 765 770 775
 10 ggc ggc aag ccg tac gcg ggc ggc ctt ggc ggc atc ggc aaa tgg acg 2643
 Gly Gly Lys Pro Tyr Ala Gly Gly Leu Gly Gly Ile Gly Lys Trp Thr
 780 785 790
 ttc gag gac ttc gag cgc gcg gtg cgg cac ggc gtg tcg aag aac ggc 2691
 Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala Val Arg His Gly Val Ser Lys Asn Gly
 15 795 800 805
 gac aac ctg tat ccg gcg atg ccg tac gtg tcg tac gcg aag atc aag 2739
 Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met Pro Tyr Val Ser Tyr Ala Lys Ile Lys
 810 815 820 825
 gac gac gac gta cgc gcg ctg tac gcc tac ttc atg cac ggc gtc gag 2787
 20 Asp Asp Asp Val Arg Ala Leu Tyr Ala Tyr Phe Met His Gly Val Glu
 830 835 840
 ccg gtc aag cag gcg ccg ccg aag aac gag atc cca gcg ctg cta agc 2835
 Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro Lys Asn Glu Ile Pro Ala Leu Leu Ser
 845 850 855
 25 atg cgc tgg ccg ctg aag atc tgg aac tgg ctg ttc ctg aag gac ggc 2883
 Met Arg Trp Pro Leu Lys Ile Trp Asn Trp Leu Phe Leu Lys Asp Gly
 860 865 870
 ccg tac cag ccg aag ccg tcg cag agc gcc gaa tgg aat cgc ggc gcg 2931
 Pro Tyr Gln Pro Lys Pro Ser Gln Ser Ala Glu Trp Asn Arg Gly Ala

	875	880	885	
	tat ctg gtg cag ggt ctc gcg cac tgc agc acg tgc cac acg ccg cgc	2979		
	Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala His Cys Ser Thr Cys His Thr Pro Arg			
	890	895	900	905
5	ggc atc gcg atg cag gag aag tcg ctc gac gaa acc ggc ggc agc ttc	3027		
	Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys Ser Leu Asp Glu Thr Gly Gly Ser Phe			
	910	915	920	
	ctc gcg ggg tcg gtg ctc gcc ggc tgg gac ggc tac aac atc acg tcg	3075		
	Leu Ala Gly Ser Val Leu Ala Gly Trp Asp Gly Tyr Asn Ile Thr Ser			
10	925	930	935	
	gac ccg aat gcg ggg atc ggc agc tgg acg cag cag cag ctc gtg cag	3123		
	Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Ser Trp Thr Gln Gln Gln Leu Val Gln			
	940	945	950	
	tat ttg cgc acc ggc agc gtg ccg ggc gtc gcg cag gcg gcc ggg ccg	3171		
15	Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Val Ala Gln Ala Ala Gly Pro			
	955	960	965	
	atg gcc gag gcg gtc gag cac agc ttc tcg aag atg acc gaa gcg gac	3219		
	Met Ala Glu Ala Val Glu His Ser Phe Ser Lys Met Thr Glu Ala Asp			
	970	975	980	985
20	atc ggt gcg atc gcc acg tac gtc cgc acg gtg ccg gcc gtt gcc gac	3267		
	Ile Gly Ala Ile Ala Thr Tyr Val Arg Thr Val Pro Ala Val Ala Asp			
	990	995	1000	
	agc aac gcg aag cag ccg cgg tcg tcg tgg ggc aag ccg gcc gag gac	3315		
	Ser Asn Ala Lys Gln Pro Arg Ser Ser Trp Gly Lys Pro Ala Glu Asp			
25	1005	1010	1015	
	ggg ctg aag ctg cgc ggt gtc gcg ctc gcg tcg tcg ggc atc gat ccg	3363		
	Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala Ser Ser Gly Ile Asp Pro			
	1020	1025	1030	
	gcg cgg ctg tat ctc ggc aac tgc gcg acg tgc cac cag atg cag ggc	3411		

Ala Arg Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr Cys His Gln Met Gln Gly
 1035 1040 1045
 aag ggc acg ccg gac ggc tat tac ccg tgc ctg ttc cac aac tcc acc 3459
 Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Ser Leu Phe His Asn Ser Thr
 5 1050 1055 1060 1065
 gtc ggc gcg tgc aat ccg tgc aac ctc gtg cag gtg atc ctg aac ggc 3507
 Val Gly Ala Ser Asn Pro Ser Asn Leu Val Gln Val Ile Leu Asn Gly
 1070 1075 1080
 gtg cag cgc aag atc ggc agc gag gat atc ggg atg ccc gct ttc cgc 3555
 10 Val Gln Arg Lys Ile Gly Ser Glu Asp Ile Gly Met Pro Ala Phe Arg
 1085 1090 1095
 tac gat ctg aac gac gcg cag atc gcc gcg ctg acg aac tac gtg acc 3603
 Tyr Asp Leu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Ala Leu Thr Asn Tyr Val Thr
 1100 1105 1110
 15 gcg cag ttc ggc aat ccg gcg gcg aag gtg acg gag cag gac gtc gcg 3651
 Ala Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val Thr Glu Gln Asp Val Ala
 1115 1120 1125
 aag ctg cgc tga catagtcggg cgccgcgaca cggcgcaacc gataggacag gag 3706
 Lys Leu Arg
 20 1130

<210> 2

<211> 168

<212> PRT

25 <213> Pseudomonas putida

<400> 2

Met His Asn Asp Asn Thr Pro His Ser Arg Arg His Gly Asp Ala Ala

1

5

10

15

Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln Gly Ala Leu Ala Leu
 20 25 30
 Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu Arg Ala Leu Ala Asp
 35 40 45
 5 Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met Thr Leu Ser Glu Ser
 50 55 60
 Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile Gly Glu Arg Leu Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala Asp Ser Leu Pro Gln
 10 85 90 95
 Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr Pro Glu Gln Glu Ser
 100 105 110
 Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu Gly Ile Val Asp Asn
 115 120 125
 15 Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe Gly Val Val Ser Asp
 130 135 140
 Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys Pro Gly Phe Trp Ala
 145 150 155 160
 Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala
 20 165
 <210> 3
 <211> 539
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas putida*
 25
 <400> 3
 Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys

	20	25	30
	Ala Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile		
	35	40	45
	Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro		
5	50	55	60
	Tyr Pro Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn		
	65	70	75
	Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile		
	85	90	95
10	Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg		
	100	105	110
	Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg		
	115	120	125
	Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala		
15	130	135	140
	Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr		
	145	150	155
	Ser Pro Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe		
	165	170	175
20	Asn Glu Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe		
	180	185	190
	His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly		
	195	200	205
	Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile		
25	210	215	220
	Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala		
	225	230	235
	Gly Ala Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly		
	245	250	255

Pro Asp Lys Arg Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala
260 265 270
Glu His Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile
275 280 285
5 Glu Thr Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn
290 295 300
Gly Val Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His
305 310 315 320
Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly
10 325 330 335
Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro
340 345 350
Phe Arg Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser
355 360 365
15 Arg Ile Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met
370 375 380
Lys Pro Asp Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr
385 390 395 400
Val Gln Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg
20 405 410 415
Ile Val Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro
420 425 430
Glu Ile Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His
435 440 445
25 Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp
450 455 460
Val Val Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ser
465 470 475 480
Thr Ile Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys

485 490 495
Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ala Thr Met
500 505 510
Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala
5 515 520 525
Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val
530 535

<210> 4
10 <211> 27
<212> PRT
<213> Pseudomonas putida

<400> 4
15 Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu
1 5 10 15
Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp
20 25

20 <210> 5
<211> 425
<212> PRT
<213> Pseudomonas putida

25 <400> 5
Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu Pro Gly Phe
1 5 10 15
Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala
20 25 30 35

Thr Ala Met Pro Val Pro Met Leu Gly Lys Ile Tyr Thr Ser Asn Ile Thr Pro Asp
 40 45 50 55
 Pro Asp Thr Gly Asp Cys Met Ala Cys His Thr Val Lys Gly Gly Lys Pro Tyr Ala
 60 65 70 75Gly
 5 Gly Leu Gly Gly Ile Gly Lys Trp Thr Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala Val Arg
 80 85 90
 95
 His Gly Val Ser Lys Asn Gly Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met Pro Tyr Val Ser Tyr
 100 105 110
 10 Ala Lys Ile Lys Asp Asp Asp Val Arg Ala Leu Tyr Ala Tyr Phe Met His Gly Val
 115 120 125 130
 Glu Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro Lys Asn Glu Ile Pro Ala Leu Leu Ser Met Arg
 135 140 145 150
 Trp Pro Leu Lys Ile Trp Asn Trp Leu Phe Leu Lys Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Lys
 15 155 160 165 170Pro
 Ser Gln Ser Ala Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala His
 175 180 185 190
 Cys Ser Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys Ser Leu Asp Glu
 195 200 205
 20 Thr Gly Gly Ser Phe Leu Ala Gly Ser Val Leu Ala Gly Trp Asp Gly Tyr Asn Ile
 210 215 220 225
 Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Ser Trp Thr Gln Gln Gln Leu Val Gln
 230 235 240 245
 Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Val Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala Glu
 25 250 255 260 265
 Ala Val Glu His Ser Phe Ser Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Ala Ile Ala Thr
 270 275 280
 Tyr Val Arg Thr Val Pro Ala Val Ala Asp Ser Asn Ala Lys Gln Pro Arg Ser Ser
 285 290 295 300

Trp Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala Ser Ser
305 310 315 320
Gly Ile Asp Pro Ala Arg Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr Cys His Gln Met Gln
325 330 335 340Gly
5 Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Ser Leu Phe His Asn Ser Thr Val Gly
345 350 355 360
Ala Ser Asn Pro Ser Asn Leu Val Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys Ile
365 370 375
Gly Ser Glu Asp Ile Gly Met Pro Ala Phe Arg Tyr Asp Leu Asn Asp Ala Gln Ile
10 380 385 390 395
Ala Ala Leu Thr Asn Tyr Val Thr Ala Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val Thr
400 405 410 415
Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg
420 425

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10541

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/53, 9/04, 1/21// (C12N1/21, C12R1:38)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09-90, 9/04, 1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, MEDLINE (STN),
WPIDS (STN), BIOSIS (STN), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AU 2002-10991 A1 (Koji SODE), 15 May, 2002 (15.05.02), Full text & EP 1331272 A1 & WO 02/36779 A1 Full text	1-16
E, X	JP 2003-274964 A (Koji SODE), 30 September, 2003 (30.09.03), Claims 3 to 7; Par. No. [0024] (Family: none)	1-16
P, A	INOSE, K. et al., Cloning and expression of the gene encoding catalytic subunit of thermostable glucose dehydrogenase from Burkholderia cepacia in Escherichia coli, Biochim.Biophys.Acta., 21 February, 2003 (21.02.03), Vol.1645, No.2, p.133-8	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
07 October, 2003 (07.10.03)

Date of mailing of the international search report
21 October, 2003 (21.10.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10541

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STOVER, c.k. et al., Complete genome sequence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01, an opportunistic pathogen, Nature, 31 August, 2000 (31.08.00), Vol.406, No.6799, p.959-64	1-16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/53, 9/04, 1/21// (C12N1/21, C12R1:38)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/09-90, 9/04, 1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq MEDLINE (STN) WPIDS (STN) BIOSIS (STN) JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	AU 2002-10991 A1 (SODE Koji) 2002. 05. 15, 全文 & EP 1331272 A1 & WO 02/36779 A1, 全文	1-16
EX	JP 2003-274964 A (早出 広司) 2003. 09. 30, 特許請求の範囲3-7, 【0024】段落 (ファミリーなし)	1-16
PA	INOSE K et al., Cloning and expression of the gene encoding catalytic subunit of thermostable glucose dehydrogenase from Burkholderia cepacia in Escherichia coli, Biochim Biophys Acta, 21 February 2003, Vol. 1645, No. 2, p. 133-8	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 10. 03

国際調査報告の発送日

21.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中晴絵

4 N

9 7 3 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	STOVER, c. k. et al, Complete genome sequence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01, an opportunistic pathogen, Nature, 31 August 2000, Vol. 406, No. 6799, p. 959-64	1-16